

УДК 577.152.28

Теплюк Н. М., Самойленко А. А., Лебедева Л. М., Сазонова Л. Я.,
Щербина М. С., Перепелюк М. М., Оболенська М. Ю.

ДЕТОКСИКАЦІЙНА ФУНКЦІЯ ПЛАЦЕНТИ ЛЮДИНИ ТА ЇЇ ОСОБЛИВОСТІ ЗАЛЕЖНО ВІД ГЕНОТИПІВ ЦИТОХРОМУ P450 1A1, ГЛУТАТІОНТРАНСФЕРАЗИ P1 ТА M1

Досліджено глутатіонтрансферазну активність цитозолу в зразках плаценти людини з різним генотипом цитохрому P450 1A1 і глутатіонтрансфераз класу P1 та M1, а також експресію глутатіонтрансферази P1 в культурі клітин хоріокарциноми людини в умовах короткочасної індукції цитохрому P450 1A1 бензпіреном. Виявлено, що в клітинах плаценти у фізіологічних умовах і внаслідок короткочасної індукції цитохрому P450 1A1 глутатіонтрансферазна активність цитозолу та експресія глутатіонтрансферази позитивно корелюють з активністю/експресією цитохрому P450 1A1.

Детоксикаційна система - це система ферментів, які знешкоджують ендогенні та численні чужорідні (ксенобіотики) сполуки і зумовлюють їх виведення із організму. Розрізняють дві послідовні стадії детоксикації - окиснення мікросомальними монооксигеназами, а саме цитохромами P450, і кон'югацію продуктів окиснення з такими речовинами, як глутатіон, глюкуронова, сірчана або оцтова кислоти під дією відповідно глутатіон S-трансфераз (ГТ-аз), UDP-глюкуронілтрансфераз, сульфотрансфераз або ацетилтрансфераз. На кожній стадії детоксикації вихідні сполуки залежно від їх природи можуть бути перетворені на менш реакційноспроможні сполуки, інактивовані або, навпаки, набувати більшої токсичності. Тому підвищена активність ферментів детоксикації не завжди є позитивним фактором. Для численних ксенобіотиків перша стадія детоксикації - активаційна, друга - навпаки, знешкоджуюча. Отже, співвідношення активностей ферментів обох стадій є суттєвою складовою ефективності процесу детоксикації.

В організмі людини найактивніше детоксикація ксенобіотиків відбувається у печінці, меншою мірою в інших органах, зокрема в плаценті. Перебіг вагітності та стан здоров'я дитини залежать від ефективності детоксикації в цьому органі. В плаценті, на відміну від інших тканин, експресуються поодинокі ферменти детоксикації - цитохром P450 1A1 (CYP1A1) і глутатіонтрансферази (ГТ-ази) класу π (GSTP1) і класу μ (GSTM1). Активність GSTP1 становить близько 95 % загальної ГТ-азної активності в плаценті. Через обмежену експресію ферментів детоксикації плаценту можна розглядати як природою надану модель для

дослідження процесів детоксикації. Гени CYP1A1, GSTP1 та GSTM1 є поліморфними, що зумовлює індивідуальну каталітичну активність відповідних білків.

Мета даної роботи полягає в з'ясуванні питання як узгоджується функціонування ферментів двох послідовних стадій детоксикації з огляду на поліморфність ферментів і на їх індукцибельність.

Показано, що ГТ-азна активність цитозолу в зразках з ізоформою CYP1A1 Ile/Val вища, ніж в зразках з CYP1A1 Ile/Пе ізоформою. Короткочасна індукція експресії CYP1A1 супроводжується підвищенням ГТ-азної активності цитозолу.

Результати та обговорення

У зразках зрілої плаценти від породіль із центральної України нами було визначено характер поліморфізму генів CYP1A1, GSTP1 та GSTM1 в положеннях основ/амінокислот, наведених у таблиці, а також ГТ-азну активність цитозолу з штучним субстратом хлординітробензолом (ХДНБ). Результати ферментативної активності проаналізовано залежно від характеру генотипу ферментів. ГТ-азна активність цитозолу знижується в ряду He/He-, Ile/Val- та Val/Val-ізоформ білка GSTP1, що узгоджується з даними літератури [1]. ГТ-азна активність цитозолу не виявляє залежності від генотипу GSTM1, ймовірно, за рахунок малої кількості цієї ізоформи в плаценті.

У носіїв гетерозиготної форми Ile/Val білка CYP1A1 ГТ-азна активність цитозолу достовірно вища, ніж у носіїв гомозиготної форми Ile/Ile ($56,5 \pm 17,4$ проти $22,1 \pm 2,4$ нмоль/мг білка

Таблиця. Ферменти детоксикації в плаценті людини та їх генетичний поліморфізм

Ген	Фермент	Мутації в		Каталітична активність ізоформ	Алельні варіанти	Генотипи
		гені	білку			
CYP1A1	Цитохром P450 1A1	4889 A->G	AMK462: He ->Val	Val > He	He, Val	PeЯIe, Ile/Val, Val/Val
GSTP1	Глутатіон-трансфераза P1	1403 A->G	AMK104: He ->Val	Val < He (субстрат - ХДНБ)	He, Val	PeIle, He/Val, Val/Val
GSTM1	Глутатіон-трансфераза M1	Делеція	Відсутній	Відсутня	(+), (-)	GSTM1 (+), GSTM1 (-)

за 1 хв, $P < 0.01$). Оскільки ця різниця зберігається у осіб, в яких GSTM1 нема, то це наводить на думку, що активність GSTP1, ферменту другої стадії детоксикації, якимось чином залежить від генотипу ферменту першої стадії детоксикації CYP1A1. Дані щодо каталітичної активності/експресії He- та Val-форм CYP1A1 суперечливі, але більшість з них свідчить про більш високу активність/експресію Val-форми [2-4]. Це означає, що на I стадії детоксикації утворюється більше продуктів реакції, які, в свою чергу, є субстратами або індукторами генів, які кодують ферменти II стадії [5].

Щоб з'ясувати, чи є продукти монооксигеназної реакції за участю CYP1A1 індукторами гена GSTP1, нами було проведено дослід з клітинами хоріокарциноми людини BeWo. Клітини культивували в присутності 50 мкМ бензо(а)пірену, типового субстрату та індуктора білка CYP1A1. Через 48 год від початку культивування в клітинах виявили підвищений в 3,4 рази вміст білка CYP1A1 за даними Western-блот аналізу, а також у 5 разів вищий вміст GSTP1-специфічної мРНК за нормалізованими результатами Northern-гібридизації.

Отже, в клітинах плаценти людини як за фізіологічних умов, так і внаслідок короткочасної дії бензо(а)пірену підвищена активність CYP1A1 супроводжується підвищеною експресією/активністю GSTP1. Роль індукторів GSTP1 можуть виконувати або продукти окиснення вихідних сполук або побічні продукти монооксигеназної реакції - супероксидний радикал та його мішені. За нашими попередніми результатами, у носіїв Ile/Val-форм CYP1A1 вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів вищий, ніж у носіїв Ile/Ile-форм, а також більш низький рівень відновлених низькомолекулярних тіолів [6]. Тобто участь супероксидного радикала і зсув окисно-відновного потенціалу в кислу сторону в індукції GSTP1 вельми вірогідні.

З огляду на наведені в цій статті результати виникає потреба в обговоренні даних, опублі-

кованих нами раніше, про зниження GT-азної активності цитозолу в зразках плаценти, які було отримано в хімічно забрудненому, переважно бензо(а)піреном, Запоріжжі [7]. Зниження мало зворотний характер, і GT-азна активність відновлювалась *in vitro* відновлювальним агентом дитіотроейтолом [7]. Отже, у випадку хронічного впливу ксенобіотиків, на відміну від короткочасного впливу, фермент інактивується і, зокрема, за рахунок окиснення SH-груп.

Таким чином, GT-азна активність у плаценті людини залежить, серед інших факторів, від тривалості впливу ксенобіотиків та від індивідуальних особливостей генотипу CYP1A1 та GSTP1, що має бути враховано при оцінці стану детоксикаційної спроможності не тільки плаценти, але й організму в цілому.

Матеріали та методи

Техніку забору зразків зрілої плацентарної тканини, їх обробки та зберігання перед використанням для біохімічних аналізів, принципи складання персональних опитувальників описано раніше [6, 7]. Глутатіонтрансферазну активність цитозолу визначали в реакції з ХДНБ [8]. Генотип ферментів CYP1A1, GSTP1 та GSTM1 визначали за довжиною рестрикційних фрагментів відповідних ділянок ДНК, які було ампліфіковано за допомогою полімеразної ланцюгової реакції [9-11]. Клітини хоріокарциноми людини лінії BeWo культивували в рекомендованих умовах. Після доби росту середовище змінювали та до свіжого середовища додавали бензо(а)пірен у 0,001 %-му диметилсульфоксиді до кінцевої концентрації 50 мкМ (у контролі використовували 0,001 %-й диметилсульфоксид). Після 48 год інкубації з бензо(а)піреном клітини промивали двічі їх PBS. знімали їх шкребком та використовували для Western- і Northern-аналізів за стандартними протоколами [12, 13]. Гібридизацію РНК, зафіксовану на фільтрах, проводили із зондом * ДНК до GSTP1 людини, що був люб'язно наданий д-ром Кано (Японія).

1. Zimniak P., Nanduri B., Pikula S. *et al.* Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP 1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzyme properties // Eur. J. Biochem.- 1994.- V. 224.- N 3.- P. 893-899.
2. Kawajiri K., Nakachi K., Imai K. *et al.* The CYP1A1 gene and cancer susceptibility // Crit. Reviews in Oncology/Hematology.- 1993.- V. 14.- N 1.- P. 77-87.
3. Landi M. T., Bertazzi P. A., Clark G. *et al.* Susceptibility markers in normal subjects: a pilot study for the investigation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin related diseases // Chemosphere.- 1993.- V. 27.- P. 375-381.
4. Crofts F., Taioli E., Trachman J. *et al.* Functional Significance of different human CYP1A1 genotypes // Carcinogenesis.- 1994.- V. 15- N 12.- P. 2961-2963.
5. Prochaska H. J., Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver // Cancer Res.-1988.-V. 48,- N 17.- P. 4776-4782.
6. Теплюк Н. М., Лебедева Л. М., Конопієц Л. И. *и др.* Фено- и генотипирование детоксикационной системы плаценты в экологически неблагоприятных районах Украины // Укр. біохім. журн.-2001.-Т. 73.- № 3.- С. 126-134.
7. Оболенська М. Ю., Чайковська Т. Л., Лебедева Л. М. *та ін.* Детоксикаційна функція плаценти у породіль з екологічно несприятливих районів України // Укр. біохім. журн.- 1997.- Т. 70.- № 2.- С. 89-97.
8. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione-S-transferase // J. Biol. Chem.- 1974.- V. 249.- N 22.- P. 7130-7139.
9. Shields P. G., Bowman E. D., Harrington A.M. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes // Cancer Res.- 1993- V.53- N 15- P. 3486-3492.
10. Harries L-W., Stubbins M-J., Forman D. *et al.* Identification of genetic polymorphism at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer // Carcinogenesis.- 1997.- V.18.- N4.- P. 641-644.
11. Comstock K. E., Sanderson B. J. S., Clafin G. *et al.* GST1 gene deletion determined by polymerase chain reaction // Nucleic Acids Res.- 1990.- V. 18.- N 12.- P. 3670.
12. Chomczynski P., Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction // Analytical Biochemistry.-1987- V. 162,- N 1,- P. 156-159.
13. Sambrook, J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual / 2-nd edit.- Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

N. M. Teplyuk, A. A. Samoylenko, L. M. Lebedeva, L. Yu. Sazonova, M. S. Shcherbina, M. M. Perepelyuk, M. Yu. Obolenska

DETOXICATION FUNCTION OF PLACENTA AND ITS PECULIARITIES DUE TO P4501A1, GSTP1 AND M1 GENOTYPES

Glutathione transferase activity of cytosol was investigated in placenta samples with different genotypes of cytochrome P4501A1 and glutathione transferase PI and M1. Glutathione transferase PI expression was studied also in human choriocarcinoma cells after short term induction of P450 1A1 with benzopyren. It was shown that in placenta cells in physiological conditions and after shortterm induction of benzopyren glutathione transferase activity of cytosol and GST expression positively correlate with the activity/expression of cytochrome P4501A1.